Iranian Journal of Animal Science Research
Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

Research Article
Vol. 16, No.2, 2024, p. 171-186

Effects of Dietary Organic Chromium Supplementation on Laying Performance, Egg Quality, Immune and Blood Biochemical Parameters of Laying Hens in the Late Phase of Production

Mehrdad Karimi[1], Majid Olyayee[2*], Hossein Jonmohammadi[3], Rohollah Kianfar[4], Fatemeh Khademnasi[5]

1, 2, 3, 4 and 5- M.Sc. Graduate, Associated Professor, Professor, Associated Professor and Ph.D. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran, respectively.
*Corresponding Author's Email: majidolyayee@tabrizu.ac.ir

Received: 03-01-2023 Revised: 28-02-2023 Accepted: 01-03-2023 Available Online: 01-03-2023	**How to cite this article:** Karimi, M., Olyayee, M., Jonmohammadi, H., Kianfar, R., & Khademnasi, F. (2023). Effects of dietary organic chromium supplementation on laying performance, egg quality, immune and blood biochemical parameters of laying hens in the late phase of production. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *16*(2), 171-186. (In Persian with English Abstract). http://doi.org/10.22067/ijasr.2023.80958.1127

Introduction: Although minerals include a small part of the total cost of poultry feed, they perform special functions in the body. Given that today's birds are primarily raised under stressful conditions (including high production demands, environmental stress, heat, and exposure to various other stress factors), their nutrient metabolism, including the absorption of minerals, has changed. This has led to decreased feed consumption, reduced mineral absorption, and consequently, increased excretion of minerals. Minerals that serve as cofactors for many enzymes are crucial; thus, to support proper functioning and enhance the immune system's response, higher amounts of these nutrients are required in diets. Chromium (Cr) is a critical micronutrient for humans and animals. It contributes to physiological and nutritional efficiency. Chromium increases glucose glycogenesis, promotes glucose transport, and increases protein synthesis. Chromium is important in protein digestion and reduction of lipid peroxidation and increased growth production. Chromium deficiency is associated with reduced growth rate, and glucose, and protein metabolism. Under environmental, nutritional, and hormonal stress, the benefits of chromium supplementation clearly demonstrated. Considering that with the increase in age and egg size, the egg quality decreases, and also the function of the immune system decreases at the late phase of egg production. Therefore, supplementation of layer hen diets with some nutrients at the end of the production period can improve the egg quality and potentiate the humoral immune response. Thus, the subject of the current study was to investigate the effects of dietary supplementation of chromium-methionine on egg laying performance, egg quality traits at different storage times and temperatures, humoral immune response, and some blood biochemical parameters of laying hens at late–phase of the egg production cycle.

Materials and Methods: A total of 120 Leghorn laying hens (Hy-line W36, 73 weeks- old) were assigned in a completely randomized design with 6 dietary treatments, 5 replicates and 4 laying hens in each replicate for 6 weeks. The experimental treatments were 6 levels of chromium-methionine supplementation (0, 400, 800, 1200, 1600, and 2000 µg/kg of diet) of corn-soybean meal-based diet. The hens were housed in a 60 × 60 × 40 cm cage. All hens were housed in an environmentally controlled house with temperature maintained at approximately 25ºC. The house had controlled ventilation and lighting (16L: 8D). All hens were supplied with feed and water ad libitum. The hen-day egg production, egg weight, egg mass, feed intake, and feed conversion ratio were recorded daily. The feed conversion ratio was expressed in kilograms of feed consumed per kilogram of the egg mass. The effects of organic chromium supplementation of laying hens on egg quality traits were evaluated every 2 weeks at 75, 77, and 79 weeks of age. The egg shape index was calculated by dividing egg length to egg width. At the end of the experiment, to measure certain blood parameters, one bird from each replicate was selected, and blood was drawn from the wing vein. After preparing the serum, the concentrations of triglycerides, cholesterol, total protein, albumin, globulin, uric acid, alanine transaminase, aspartate

http://doi.org/10.22067/ijasr.2023.80958.1127

transaminase, glucose, and malondialdehyde were measured using Pars Azmoon kits according to the manufacturer's instructions.

Results and Discussion: Supplementing the diet with chromium-methionine had a significant effect on laying performance (including feed intake, feed conversion ratio, and egg production) and egg quality traits (such as eggshell weight, yolk color, yolk weight, albumen height, and Haugh unit). The results showed that birds fed 2000 µg/kg chromium-methionine had the lowest feed intake and the best feed conversion ratio and egg production percentage were observed with the addition of 1600 and 2000 g/kg organic chromium. By suppressing stress factors, chromium can increase the ovulation rate and increase the percentage of egg production. Addition of organic chromium except 2000 µg/kg improved albumen height and Haugh unit compared to the control group. The interaction effect between egg storage time and storage temperature on the yolk height and yolk percentage, albumen and yolk pH were significant. Carotenoids are responsible for the color of the yolk and they are a part of the fat-soluble compounds, so any factor that can improve the digestion and absorption of fats will probably lead to an increase in the color of the egg yolk. Haugh unit is a measure to determine the quality of egg white, which determines the quality of the egg. The higher HU means better egg quality (fresher, higher quality eggs have thicker whites). Blood serum cholesterol of chickens fed with 800 µg/kg of chromium-methionine decreased compared to the control group. The lowest serum concentration of malondialdehyde was observed using 1600 and 2000 µg/kg organic chromium. Addition of 1600 µg/kg of chromium-methionine increased total immunoglobulin production against sheep red blood cells. The effects of dietary chromium supplementation on improving immune responses can be attributed to its antioxidant activity. By enhancing antioxidant activity, chromium reduces the production of corticosterone, a potent suppressor of immune system function. This reduction in corticosterone levels prevents the decrease in lymphocyte production and proliferation, ultimately supporting the continued production of antibodies.

Conclusion: In total, dietary supplementation of 1600 µg/kg chromium-methionine can improve egg laying performance including feed conversion ratio, egg production, and egg mass, as well as egg quality traits such as egg shell weight and albumen height of laying hens at the late-phase of laying cycle. Supplementation of layer diets with 1600 µg/kg organic chromium improved the humoral immune response at the late-phase of egg production cycle by increasing the production of total immunoglobulin against sheep red blood cells.

Keywords: Humoral immunity, Egg quality, Chromium-methionine, Blood parameters, Laying hens

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۱۶، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۳، ص. ۱۸۶-۱۷۱

اثرات مکمل جیره‌ای کروم آلی بر عملکرد تولید، کیفیت تخم‌مرغ، فراسنجه‌های ایمنی و بیوشیمیایی خون مرغ‌های تخم‌گذار در اواخر دوره تولید

مهرداد کریمی[۱]، مجید علیایی[۲*]، حسین جان‌محمدی[۳]، روح الله کیانفر[۴]، فاطمه خادم‌ناسی[۵]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۱۸
تاریخ بازنگری:۱۴۰۲/۰۸/۱۷
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۲۱

چکیده

این تحقیق به‌منظور بررسی اثرات افزودن سطوح مختلف کروم آلی بر عملکرد تولید تخم‌مرغ، کیفیت تخم‌مرغ در زمان و دمای مختلف نگهداری و عملکرد سیستم ایمنی و بیوشیمیایی خون با استفاده از ۱۲۰ قطعه مرغ تخم‌گذار نژاد لگهورن سویه‌های لاین W36 در سن ۷۳ هفتگی در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تیمار، پنج تکرار و چهار قطعه پرنده در هر تکرار طراحی شد. جیره‌های آزمایشی عبارت بودند از: ۱- شاهد (بدون افزودن کروم آلی)، ۲ الی ۶- جیره شاهد به‌همراه افزودن سطوح ۴۰۰، ۸۰۰، ۱۲۰۰، ۱۶۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم کروم آلی در هر کیلوگرم جیره (µg/kg). نتایج نشان داد که مرغ‌های دریافت‌کننده ۲۰۰۰ µg/kg کروم- متیونین، کمترین مصرف خوراک را داشتند و بهترین ضریب تبدیل خوراک و درصد تولید تخم‌مرغ با افزودن ۱۶۰۰ g/kg و ۲۰۰۰ کروم آلی مشاهده شد. افزودن کروم آلی به‌جز ۲۰۰۰ میکروگرم در هر کیلوگرم ارتفاع سفیده و واحد هاو را در مقایسه با گروه کنترل بهبود داد. اثر متقابل بین مدت زمان و دمای نگهداری تخم‌مرغ بر ارتفاع و درصد زرده، pH سفیده و زرده تخم‌مرغ معنی‌دار بود. کلسترول سرم خون مرغ‌های تغذیه شده با ۸۰۰ µg/kg کروم- متیونین در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت. کمترین غلظت سرمی مالون دی‌آلدهید با استفاده از ۱۶۰۰ µg/kg و ۲۰۰۰ کروم آلی در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد. افزودن ۱۶۰۰ µg/kg کروم- متیونین موجب افزایش تولید ایمونوگلوبولین کل بر علیه گلبول قرمز گوسفند شد. در مجموع، افزودن ۱۶۰۰ µg/kg کروم- متیونین می‌تواند اثرات سودمندی بر مرغ‌های تخم‌گذار مسن با بهبود عملکرد تولید، عملکرد سیستم ایمنی هومورال و کاهش غلظت مالون دی آلدهید سرم داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: ایمنی هومورال، فراسنجه‌های خونی، کروم - متیونین، کیفیت تخم‌مرغ، مرغ تخم‌گذار

مقدمه

اگر چه مواد معدنی تنها بخش کوچکی از هزینه‌های خوراک طیور را تشکیل می‌دهند، امّا وظایف ویژه‌ای را در بدن ایفا می‌کنند، به‌عنوان مثال، این مواد در وظایف ساختمانی، به‌عنوان کوفاکتور در بسیاری از واکنش‌های آنزیمی، در متابولیسم پروتئین، چربی و کربوهیدرات و سایر فرایندهای بیولوژیکی نقش ایفا می‌کنند. با توجه به اینکه پرندگان امروزی عمدتاً تحت شرایط تنش‌زا (مانند سرعت تولید زیاد، تراکم پرورش، محیط پرورش، دمای پرورش و تنش‌های تغذیه‌ای، فیزیولوژیکی و محیطی) پرورش می‌یابند، متابولیسم مواد مغذی در آن‌ها تغییر می‌کند و با کاهش مصرف خوراک، جذب مواد معدنی نیز کاهش می‌یابد. این باعث افزایش دفع مواد معدنی می‌شود که به‌عنوان کوفاکتورهای آنزیمی برای بسیاری از فرایندهای زیستی ضروری هستند. بنابراین، برای حمایت از عملکرد مناسب و بهبود عملکرد سیستم ایمنی، نیاز به مصرف مقادیر بیشتری از این مواد مغذی در جیره‌های غذایی طیور وجود دارد. کروم یکی از عناصر کم مصرف و ضروری برای انسان و حیوانات است (Nattapon *et al*., 2012) که اولین بار توسط شوارتز و مرتز در سال ۱۹۵۹ به‌عنوان یک عنصر ضروری در موش تشخیص داده شد و ضرورت آن در انسان در سال ۱۹۷۷ میلادی مشخص شد (Jeejeebhoy *et al*., 1977). از دهه ۱۹۹۰ میلادی به بعد، کروم به‌صورت گسترده‌ای به‌عنوان یک عنصر ضروری در حیوانات اهلی (مانند گاو، گوسفند، اسب، خوک و طیور) مورد مطالعه قرار گرفته است (Pechova and Pavlata,

---

۱، ۲، ۳، ۴ و ۵- به‌ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار، استاد، دانشیار و دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
(*- نویسنده مسئول: (Email: majidolyayee@tabrizu.ac.ir
http://doi.org/10.22067/ijasr.2023.80958.1127

2007).

کروم وظایف مهمی در بدن دارد. کروم در بدن توسط ترکیب اولیگوپپتیدی زیست فعال به‌نام کرومودیولین[1] یا ماده متصل به کروم با وزن مولکولی کم[2] انتقال می‌یابد. این پروتئین به گیرنده انسولین متصل می‌شود و منجر به افزایش جذب گلوکز به داخل سلول می شود. همچنین، کروم بخشی از پروتئین عامل تحمل گلوکز[3] (GTF) است که می‌تواند عملکرد انسولین را تقویت کرده و گلوکز را از خون به داخل سلول‌ها به‌منظور تولید انرژی منتقل کند. کروم همچنین در سوخت و ساز کربوهیدرات، پروتئین و چربی‌ها بسیار اهمیت دارد. در صورت کمبود کروم در جیره غذایی، توانایی انسولین در سوخت و ساز مواد مغذی تحت تأثیر قرار می‌گیرد (Pechova and Pavlata, 2007). کروم نرخ گلیکوژنز را افزایش می‌دهد، انتقال گلوکز را تسریع می‌کند و سبب افزایش سنتز پروتئین می‌شود (Hayirli, 2005). استفاده از مکمل کروم در جیره غذایی طیور، عملکرد تولید را بهبود می‌بخشد (Habibian *et al.*, 2013). تحت تنش‌های محیطی، تغذیه‌ای و هورمونی، افزودن کروم به‌طور قابل مشاهده‌ای بهره‌وری را افزایش می‌دهد (Sahin *et al.*, 2002). تحقیقات نشان داده است که اشکال مختلف شیمیایی کروم، از نظر قابلیت زیست فراهمی و تأثیر بر حیوانات مختلف، متفاوت هستند. همچنین ثابت شده است که منابع آلی کروم، نسبت به منابع معدنی، دارای زیست‌فراهمی بهتری هستند. کروم پیکولینات، کروم نیکوتینات، کروم پروپیونات (کروم متصل به مخمر) و کروم- متیونین، رایج‌ترین شکل‌های کروم هستند که به‌عنوان مکمل غذایی در جیره غذایی طیور استفاده می‌شوند (Valera *et al.*, 2019).

در سال‌های اخیر، مطالعات بیشتری در مورد استفاده از کروم و اثرات مفید آن بر طیور انجام شده است. مکمل کروم می‌تواند در کمک به حداقل رساندن اثرات نامطلوب تنش محیطی بر عملکرد رشد و تولید مؤثر باشد (Nasiroleslami and Torki, 2011). به‌طور کلی، افزودن کروم به جیره غذایی می‌تواند تولید تخم‌مرغ، ضریب تبدیل خوراک و استحکام پوسته تخم مرغ را بهبود بخشد، به‌ویژه در پرندگانی که در شرایط تنش سرمایی یا گرمایی پرورش می‌یابند (Khan *et al.*, 2014)؛ با این حال، در برخی موارد، نتایج مبهم درباره بهبود عملکرد و غلظت انسولین و گلوکز سرم (Habibian *et al.*, 2013) هنگامی که پرندگان با مکمل کروم تحت شرایط تنش گرمایی تغذیه می‌شوند، گزارش شده است. همچنین، افزودن کروم به جیره غذایی طیور می‌تواند عملکرد سیستم ایمنی را از طریق افزایش وزن نسبی اندام‌های مرتبط با سیستم ایمنی مانند تیموس، طحال و بورس فابرسیوس بهبود بخشد و نسبت هتروفیل به لنفوسیت (H/L) را کاهش دهد. همچنین، گزارش شده است که با افزودن کروم به جیره غذایی جوجه‌های گوشتی، پاسخ آنتی‌بادی بهبود می‌یابد (Luo *et al.*, 1999).

با توجه به اینکه با افزایش سن و بزرگ‌تر شدن اندازه تخم‌مرغ، کیفیت پوسته تخم‌مرغ کاهش می‌یابد و همچنین عملکرد سیستم ایمنی در اواخر دوره تولید مرغ تخم‌گذار کاهش می‌یابد؛ افزودن برخی از مواد مغذی به جیره غذایی پرندگان در اواخر دوره تولید می‌توانند کیفیت تخم‌مرغ را بهبود بخشد و وضعیت سیستم ایمنی هومورال را ارتقا دهد. بنابراین، هدف از اجرای این آزمایش، بررسی اثرات افزودن سطوح مختلف کروم آلی بر عملکرد تولید تخم، صفات کیفیت تخم مرغ در زمان و دمای مختلف نگهداری، عملکرد سیستم ایمنی هومورال و برخی از فراسنجه‌های خونی مرغ‌های تخم‌گذار است.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در سالن تحقیقات مرغ تخم‌گذار ایستگاه آموزشی و پژوهشی خلعت پوشان دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز اجرا شد. در این آزمایش، تعداد ۱۲۰ قطعه مرغ تخم‌گذار نژاد لگهورن (سویه‌های- لاین W36) از سن ۷۱ هفتگی بعد از دو هفته دوره عادت‌پذیری (درصد تولید تخم‌مرغ در شروع دوره ۴/۹۶ ± ۶۰/۴۷ درصد)، از ۷۳ هفتگی به‌مدت شش هفته مورد استفاده قرار گرفتند. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تیمار، پنج تکرار و چهار قطعه پرنده در هر تکرار اجرا شد. تیمارهای آزمایشی شامل شش سطح مکمل کروم آلی (صفر، ۴۰۰، ۸۰۰، ۱۲۰۰، ۱۶۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم کروم در هر کیلوگرم جیره غذایی) بودند. مکمل کروم آلی مورد استفاده در این تحقیق به‌شکل کروم- متیونین بود که از شرکت آمریکایی Zinpro Corp با نام تجاری MICROPLEX® تهیه گردید. این محصول حاوی ۱۰ درصد کروم و ۹۰ درصد متیونین (وزنی/وزنی) بود. بر اساس توصیه سویه‌های-لاین W-36، در کل دوره آزمایشی، ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی اعمال شد. دسترسی پرندگان به آب و خوراک به‌صورت آزادانه فراهم شد. جیره‌های آزمایشی به‌کمک نرم‌افزار UFFDA طبق توصیه‌های تغذیه‌ای سویه‌های- لاین W36 (۲۰۱۸) در سن ۷۳ هفتگی تنظیم شدند. ترکیب جیره های غذایی آزمایشی و اجزای تشکیل‌دهنده آن در جدول ۱ نشان داده شده است.

صفات عملکرد تولید

صفات عملکرد شامل درصد تولید تخم‌مرغ، وزن تخم‌مرغ، توده تخم‌مرغ تولیدی، مصرف خوراک و ضریب تبدیل خوراک مورد بررسی قرار گرفت. تخم‌مرغ‌های تولیدی، روزانه و در یک ساعت مشخص

1- Chromodulin
2- Low-molecular-weight chromium-binding substance (LMWCr)
3- Glucose tolerance factor (GTF)

(ساعت پنج عصر) جمع‌آوری، توزین و تعداد آن‌ها ثبت شد و با استفاده از معادله ۱ درصد تولید تخم‌مرغ بر اساس روز مرغ (معادله ۲) تعیین شد. برای اندازه‌گیری وزن تخم‌مرغ، ابتدا تخم‌مرغ‌های هر یک از واحدهای آزمایشی به‌صورت انفرادی توزین و برای محاسبه میانگین وزن تخم‌مرغ، در هر روز تمام تخم‌مرغ‌های تولید شده مربوط به هر واحد آزمایشی توزین شد و سپس با تقسیم وزن به تعداد تخم‌مرغ‌ها، میانگین وزن تخم‌مرغ هر واحد آزمایشی به‌صورت هفتگی محاسبه شد. از حاصل‌ضرب میانگین وزن تخم‌مرغ تولیدی در درصد تولید، توده تخم‌مرغ تولیدی به‌ازای هر مرغ در روز محاسبه گردید. مصرف خوراک هر واحد آزمایشی، از تفاضل مقدار دان توزیع شده از مقدار دان باقی‌مانده اندازه‌گیری شد. ضریب تبدیل خوراک برای تولید تخم‌مرغ در هر هفته با استفاده از معادله ۳ محاسبه شد.

معادله (۱)

$$\text{درصد تولید بر اساس روز مرغ} = \frac{\text{تعداد کل تخم‌مرغ تولیدی واحد آزمایش}}{\text{روز مرغ واحد آزمایش}} \times ۱۰۰$$

معادله (۲)

$$\text{روز مرغ} = (\text{تعداد روزهای آزمایش} \times \text{تعداد مرغ‌های زنده})$$

معادله (۳)

$$\text{ضریب تبدیل خوراک} = \frac{\text{خوراک مصرفی (گرم)}}{\text{توده تخم‌مرغ تولیدی (گرم)}}$$

صفات خارجی و داخلی کیفیت تخم‌مرغ

برای بررسی صفات کیفیت تخم‌مرغ، در پایان هر دو هفته، تعداد دو عدد تخم‌مرغ از هر تکرار (در مجموع، ۱۰ تخم‌مرغ برای هر تیمار) به‌صورت تصادفی انتخاب و به آزمایشگاه منتقل شدند. طول و عرض تخم‌مرغ با استفاده از کولیس دیجیتال با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر اندازه‌گیری شد و سپس با تقسیم کردن عرض تخم‌مرغ بر طول آن، شاخص شکل تخم‌مرغ به‌دست آمد. برای اندازه‌گیری درصد پوسته تخم‌مرغ، پس از شکستن تخم‌ها، پوسته جدا و به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در داخل آون نگهداری شد و پس از بیرون آوردن از آون و خنک شدن، وزن آن‌ها اندازه‌گیری شد و به‌صورت درصدی از وزن تخم‌مرغ بیان شد. پس از توزین، پوسته از سه مقطع (پهن، باریک و قسمت میانی) جدا شد و ضخامت پوسته تخم‌مرغ، به‌وسیله دستگاه ریزسنج مخصوص (FHK، ژاپن) با دقت ۰/۰۰۱ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. میانگین سه عدد به‌دست آمده، به‌عنوان ضخامت پوسته آن تخم‌مرغ ثبت شد. برای تعیین خاکستر پوسته، ابتدا دو گرم پوسته خشک شده برداشته و در کوره تحت دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت پنج ساعت قرار گرفت. سپس درصد خاکستر پوسته محاسبه شد. ارتفاع سفیده غلیظ تخم‌مرغ با استفاده از ریزسنج سه پایه اندازه‌گیری و واحد هاو با استفاده از معادله ۴ محاسبه شد (Torki *et al*., 2014)

$$HU = 100 \text{ Log } (AH - 1.7EW^{0.37} + 7.57) \quad \text{معادله (۴)}$$

که در آن، HU: واحد هاو، AH: ارتفاع سفیده برحسب میلی‌متر و EW: وزن تخم‌مرغ برحسب گرم می‌باشد.

برای محاسبه درصد زرده و سفیده، ابتدا زرده و سفیده جدا و توسط ترازوی الکترونیکی، توزین شدند و بر اساس درصدی از وزن تخم‌مرغ بیان شدند. صفت رنگ زرده با استفاده از مقیاس رنگ رش ارزیابی شد. شاخص زرده پس از اندازه‌گیری قطر و ارتفاع زرده تخم مرغ با استفاده از کولیس دیجیتال (با دقت ۰/۰۰۱ میلی‌متر) اندازه‌گیری و شاخص زرده از تقسیم قطر زرده به ارتفاع زرده ضربدر ۱۰۰ محاسبه شد. pH زرده و سفیده تخم‌مرغ با استفاده از pH متر HANA-210 (ساخت ایتالیا) با دقت ۰/۰۱ اندازه‌گیری شد. بدین منظور، پس از کالیبره کردن pH متر با استفاده از محلول‌های بافری استاندارد، دو گرم از سفیده و زرده برداشته و به درون بشر انتقال و با ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر به‌طور کامل مخلوط گردید. پس از یکنواخت شدن، الکترود pH متر را به درون محلول وارد کرده و پس از ثابت شدن عدد نمایشگر مقدار pH ثبت گردید. به‌منظور بررسی اثرات افزودن کروم آلی در جیره غذایی بر کیفیت تخم‌مرغ، در دما و زمان‌های مختلف نگهداری در پایان هر دو هفته آزمایش، تعداد چهار عدد تخم‌مرغ از هر تکرار اخذ و در دو زمان هفت و ۱۴ روزگی و در دو دمای یخچال (چهار درجه سانتی‌گراد) و دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند و صفات کیفیت تخم‌مرغ اندازه‌گیری شدند (Karami et al., 2018).

فراسنجه‌های سرم خون و سیستم ایمنی هومورال

در پایان دوره، به‌منظور اندازه‌گیری برخی از فراسنجه‌های سرم خون، از هر تکرار یک پرنده انتخاب و از ورید بال خون گرفته شد. سپس پس از آماده‌سازی سرم، میزان تری‌گلیسرید، کلسترول، پروتئین کل، آلبومین، گلوبولین، اسید اوریک، آنزیم‌های آلانین آمینو ترانسفراز، آسپارتات آمینو ترانسفراز، گلوکز، مالون دی‌آلدهید با استفاده از کیت‌های پارس آزمون و مطابق با دستورالعمل توصیه شده، اندازه‌گیری شدند.

برای اندازه‌گیری پاسخ ایمنی هومورال، از دو رأس گوسفند نر، ۲۰ میلی‌لیتر خون اخذ و در شیشه حاوی سیترات سدیم ریخته شد. سپس توسط سانتریفیوژ (با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه و به‌مدت ۱۰ دقیقه) گلبول‌های قرمز خون گوسفند (SRBC) از سرم و گلبول‌های سفید جدا و سه بار با بافر فسفات سالین (به‌صورت محلول ۱۰ درصد) شسته شدند. در نهایت، محلول پنج درصد گلبول قرمز گوسفند در بافر فسفات سالین تهیه شد و یک میلی‌لیتر از آن به ماهیچه سینه دو مرغ از هر تکرار تزریق شد. هفت روز پس از تزریق، از مرغ‌های تزریق

شده خون‌گیری به عمل آمد و سرم آن بـرای تعیـین ایمونوگلوبـولین کـل و ایمونوگلوبـولین G و M بـر ضـد SRBC بـه‌روش میکروهموگلوتیناسیون استفاده شد (Kuehn et al, 2006).

مدل آماری طرح آزمایشی

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی بـا شـش تیمـار و پـنج تکرار اجرا شد. مدل آماری طرح مورد استفاده به‌صورت زیر است:

$Y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$ معادله (۵)

که در آن، Y_{ij}: مقدار هر مشاهده، μ: میانگین مشـاهدات، t_i: اثـر تیمار (i=1….6) و ij: اشتباه آزمایشـی مربـوط بـه مشـاهده اسـت. داده‌های حاصل توسـط نرم‌افـزار آمـاری SAS، نسـخه ۹/۱ (SAS., 2004) و با اسـتفاده از رویـه GLM مـورد تجزیـه و تحلیـل آمـاری قرارگرفت و برای بررسی معنی‌دار بـودن تفـاوت بـین میـانگین‌هـا از آزمون توکی- کرامر در سطح پنج درصد استفاده شد. تجزیه و تحلیـل داده‌های حاصل از اثرات افزودن سطوح مختلف کـروم- متیـونین بـر صفات کیفیت تخم‌مرغ در دما و زمان‌های مختلف نگهداری در قالـب طرح کاملاً تصادفی به‌صورت فاکتوریل ۳×۲×۶ با شش سطح کروم- متیونین افزودنی جیره غذایی، دو دمای مختلف نگهداری (دمای اتـاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) و دمای یخچال (چهار درجه سانتی‌گراد)) و سه زمان مختلف نگهداری (تـازه، ۷ و ۱۴ روز نگهـداری) انجـام گرفـت. مدل آماری این آزمایش به‌صورت زیر بود:

معادله (۶)

$$y_{ijkl} = \mu + A_j + B_k + C_l + (AB)_{jk} + (AC)_{jl} + (BC)_{kl} + (ABC)_{jkl} + \varepsilon_{ijkl}$$

که در آن، y_{ijkl} : i امین مشاهده از j امـین سـطح عامـل A، k امین سطح عامل B و l امین سطح عامل C، A_j: اثـر j امـین سـطح عامل A، سطوح مختلف کروم –متیـونین جیـره غـذایی (i=1,…,6)، B_k: اثر k امین سطح عامل B ، دو دمای مختلف نگهـداری (۲۵و ۴ درجه سانتی‌گراد) (k=1, 2)، C_l: اثر l امـین سـطح عامـل C، سـه زمـان مختلـف نگهـداری (تـازه، ۷ و ۱۴ روز نگهـداری) (l=1,2,3)، $(AB)_{jk}$: اثر متقابل j امین سطح عامل A و k امین سـطح عامـل B، $(AC)_{jl}$: اثر متقابل j امین سطح عامل A و l امین سطح عامل C، $(BC)_{kl}$: اثر متقابل k امین سطح عامل B و l امین سطح عامل C، $(ABC)_{jkl}$: اثر متقابل j امین سطح عامل A و k امـین سـطح عامل B و l امین سطح عامل C و ε_{ijkl}: خطای آزمایشی می‌باشند.

جدول ۱- اجزای تشکیل‌دهنده و ترکیب شیمیایی جیره‌های غذایی آزمایشی

Table 1- The ingredient and chemical composition of experimental diets

اجزا مواد خوراکی Feed Ingredient	درصد (%)	ترکیب شیمیایی Chemical composition	واحد Unit
ذرت زرد Yellow corn	58.45	انرژی قابل سوخت و ساز Metabolisable energy (kcal/kg)	2800
کنجاله سویا (۴۴ درصد پروتئین خام) Soybean meal (44% CP)	23.52	پروتئین خام Crude protein	15.5 (%)
صدف shell	11.52	کلسیم Calcium	4.75 (%)
روغن سویا Soybean oil	3.83	فسفر قابل دسترس Available phosphorus	0.4 (%)
دی کلسیم فسفات Dicalcium phosphate (DCP)	1.36	متیونین Methionine	0.44(%)
مکمل ویتامین و مواد معدنی[۱] Vitamin and mineral premix[1]	0.5	متیونین+سیستئن Met+Cys	0.66(%)
نمک طعام Common salt	0.25	لیزین Lysine	0.8 (%)
بیکربنات سدیم Sodium bicarbonate	0.33	ترئونین Threonin	0.59 (%)
دی ال-متیونین DL-methionine	0.18	تریپتوفان Tryptophan	0.23 (%)
ال-لیزین L-lysine	0.06		

[۱] در هر کیلوگرم خوراک ویتامین و مواد معدنی تأمین شده: ویتامین A، ۱۰۰۰۰ IU ؛ ویتامین D_3، ۲۵۰۰ IU ، ویتامین E، ۱۰ IU ، ویتامین K_3، ۱۰ میلی‌گرم، ویتامین B_1، ۲/۲ میلی‌گرم، ویتامین B_2، ۴ میلی‌گرم، ویتامین B_3، ۸ میلی‌گرم، ویتامین B_6، ۲ میلی‌گرم، ویتامین B_{12}، ۰/۰۱۵ میلی‌گرم، اسید فولیک ۰/۵۶ میلی‌گرم، کولین کلراید، ۲۰۰ میلی‌گرم، منگنز، ۸۰ میلی‌گرم؛ آهن، ۵۰ میلی‌گرم؛ روی، ۶۰ میلی‌گرم؛ مس، ۱۲ میلی‌گرم؛ ید، ۱ میلی‌گرم؛ و سلنیت سدیم، ۰/۳ میلی‌گرم.

[1] Vitamins and minerals provided per kg of diet: Vitamin A, 10000 IU; Vitamin D_3, 2500 IU, Vitamin E, 10 IU, Vitamin K_3, 10 mg, Vitamin B_1, 2.2 mg, Vitamin B_2, 4 mg, Vitamin B_3, 8 mg, Vitamin B_6, 2 mg, Vitamin B_{12}, 0.015 mg, folic acid 0.56 mg, choline chloride, 200 mg, manganese, 80 mg; iron, 50 mg; zinc, 60 mg; copper, 12 mg; iodine, 1 mg; and sodium selenite, 0.3 mg.

نتایج و بحث

صفات عملکرد تولید

نتایج اثرات افزودن سطوح مختلف کروم- متیونین بر صفات عملکردی مرغ‌های تخم‌گذار در جدول ۲ ارائه شده است. اثر تیمارهای آزمایشی بر میزان مصرف خوراک روزانه معنی‌دار بود و با افزایش سطح کروم آلی در جیره غذایی مصرف خوراک به‌صورت خطی کاهش یافت (P<۰/۰۰۱). پرندگان دریافت‌کننده ۲۰۰۰ میکروگرم کروم- متیونین در هر کیلوگرم جیره غذایی کمترین میزان مصرف خوراک روزانه (۹۱/۵۴ گرم در روز) را داشتند. نتایج این پژوهش موافق و هماهنگ با نتایج یوانیک و همکاران (Uyanik et al., 2002) بود که مشاهده کردند افزودن ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مکمل کلرید کروم به جیره مرغ‌های تخم‌گذار باعث کاهش مصرف خوراک شد. درحالی‌که ساهین و همکاران (Sahin et al., 2002) گزارش کردند که استفاده از مکمل کروم در مرغ‌های تخم‌گذار مصرف خوراک را افزایش داد. وجود نتایج متناقض می‌تواند تا حدودی به سطح و نوع منبع کروم مورد استفاده مربوط باشد. افزودن کروم- متیونین به جیره غذایی ضریب تبدیل خوراک مرغ‌های تخم‌گذار را تحت تأثیر قرار داد (P<۰/۰۵). ضریب تبدیل خوراک گروه‌های تغذیه شده با کروم- متیونین در مقابل گروه شاهد کاهش یافت، به‌طوری‌که ضریب تبدیل خوراک پرندگان دریافت‌کننده سطوح ۱۶۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم در کیلوگرم کروم- متیونین کمتر از سایر تیمارها بود (P<۰/۰۰۱). موافق با نتیجه تحقیق حاضر، ساهین و همکاران (Sahin et al., 2005) در بلدرچین‌های تخم‌گذار بهبود ضریب تبدیل خوراک را با استفاده از مکمل کروم مشاهده کردند؛ درحالی‌که ژانگ و همکاران (Zhang et al., 2018) گزارش کردند که مکمل کروم بر ضریب تبدیل خوراک در مرغ‌های تخم‌گذار قهوه‌ای تأثیر معنی‌داری نداشت. در تناقض با یافته‌های این تحقیق، جهانیان و میرفندرسکی (Jahanian and Mirfendereski, 2015) در مرغ‌های تخم‌گذار گزارش کردند که سطوح کروم- متیونین جیره بر ضریب تبدیل خوراک اثر معنی‌دار ندارد. حبیبیان و همکاران (Habibian et al., 2013) گزارش کردند که افزودن مقادیر ۶۰۰ و ۱۲۰۰ میکروگرم برکیلوگرم کروم از منابع کلرید کروم و کروم متیونین به جیره جوجه های گوشتی بر افزایش وزن، مصرف خوراک و ضریب تبدیل خوراک تأثیر مثبتی نداشته است. این نتایج متفاوت می‌تواند ناشی از وضعیت کروم در حیوان، زیست‌فراهمی مکمل‌های کروم، وجود یا عدم وجود تنش، شدت تنش، میزان کروم افزوده شده، نوع پرنده، ترکیب جیره پایه و طول دوره استفاده از مکمل کروم باشد. دلیل بهبود ضریب تبدیل خوراک می‌تواند به اثرات آنتی‌اکسیدانی کروم مربوط باشد. زیرا به‌خوبی مشخص شده است که آنتی‌اکسیدان‌ها با احیای آهن سه ظرفیتی موجب بهبود جذب آهن می‌شوند، زیرا آهن دو ظرفیتی در روده جذب شده و به این ترتیب مقاومت در برابر عفونت‌ها بهتر می‌شود. آسیب‌های اکسیداتیو که منجر به تغییرات در شکل پروتئین‌ها می‌گردند، می‌توانند آنزیم‌های پانکراس را مهار و نیز مقاومت پروتئین غذایی در برابر هضم شدن را القا کنند. خاصیت آنتی‌اکسیدانی کروم می‌تواند تا حدودی با دناتوراسیون اکسیداتیو پروتئین تداخل داشته و هضم مواد غذایی و ضریب تبدیل خوراک را بهبود ببخشد.

با افزایش سطح کروم در جیره میزان تولید تخم‌مرغ نیز به‌صورت خطی افزایش یافت (P<۰/۰۰۰۱) و افزودن ۲۰۰۰ میکروگرم کروم- متیونین درصد تولید تخم مرغ بیشتری نسبت به سایر تیمارها به جزء تیمار ۱۶۰۰ میکروگرم کروم –متیونین داشت (P<۰/۰۰۱). مطابق با نتیجه مطالعه حاضر، کیم و همکاران (Kim et al., 1996) بیشترین میزان تولید تخم‌مرغ را در گروه‌هایی مشاهده کردند که بالاترین سطح کروم را دریافت کردند. کروم با سرکوب عوامل تنش‌زا قادر است نرخ تخمک‌اندازی را افزایش داده و درصد تولید تخم‌مرغ را افزایش دهد (Sahin et al., 2002). افزودن کروم به جیره غذایی در کل دوره تأثیر معنی‌داری بر وزن تخم‌مرغ تولیدی نداشت (P>۰/۰۵). هماهنگ با این نتایج، یوانیک و همکاران (Uyanik et al., 2002) نشان دادند که افزودن ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مکمل کلرید کروم به جیره مرغ‌های تخم‌گذار تأثیر معنی‌داری بر وزن تخم‌مرغ ندارد. احتمالاً بهبود اندک اندازه تخم‌مرغ در گروه‌های دارای مکمل کروم، ناشی از افزایش احتمالی قابلیت هضم پروتئین و چربی جیره غذایی می‌باشد. اثر کروم بر سوخت و ساز پروتئین‌ها از طریق تأثیر بر فعالیت انسولین صورت می‌گیرد (Pechova and Pavlata, 2007). توده تخم‌مرغ تولیدی روزانه با افزودن مکمل کروم متیونین به جیره، به‌صورت خطی افزایش پیدا کرد (P<۰/۰۰۰۱)، به‌طوری‌که تیمارهای حاوی سطوح ۱۶۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم در کیلوگرم کروم- متیونین توده تخم‌مرغ تولیدی روزانه بیشتری را در مقایسه با سایر تیمارها داشتند. مقدار توده تخم‌مرغ تولیدی روزانه از حاصل‌ضرب میانگین وزن تخم‌مرغ در درصد تولید محاسبه می‌گردد، از آنجایی که تیمارهای حاوی سطوح ۱۶۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم در کیلوگرم کروم- متیونین بیشترین درصد تولید تخم‌مرغ را داشتند، بدین ترتیب بیشترین توده تخم‌مرغ تولیدی روزانه نیز مربوط به این تیمارها بود.

صفات کیفیت تخم‌مرغ

نتایج اثرات افزودن مکمل کروم- متیونین بر صفات کیفیت خارجی تخم مرغ‌های تخم‌گذار برای کل دوره (هفته ۷۳ تا ۷۹) در جدول ۳ ارائه شده است. نتایج نشان داد که افزودن کروم- متیونین بر صفات کیفیت خارجی تخم‌مرغ (شاخص شکل تخم‌مرغ، درصد پوسته و ضخامت پوسته) به غیر از وزن پوسته تخم‌مرغ معنی‌دار نبود

(P>۰/۰۵). با افزودن کروم وزن پوسته به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد (P<۰/۰۵)، به‌طوری‌که وزن پوسته بیشتری در تیمارهای حاوی ۱۶۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم در کیلوگرم در مقایسه با شاهد مشاهده شد. در مورد صفات مرتبط با کیفیت خارجی تخم‌مرغ، اثر مدت زمان نگهداری (روز) بر وزن پوسته تخم‌مرغ معنی‌دار بود (P<۰/۰۵)، به‌طوری‌که با افزایش مدت زمان نگهداری (۷ و ۱۴ روز) وزن پوسته افزایش یافت. دمای نگهداری تخم‌مرغ بر هیچ یک از صفات کیفیت خارجی تخم‌مرغ تأثیر معنی‌دار نداشت (P>۰/۰۵). اثر متقابل کروم- متیونین با دما و مدت زمان نگهداری در صفات کیفیت خارجی تخم‌مرغ تأثیر معنی‌دار نداشت (P>۰/۰۵). ترکی و همکاران (Torki et al., 2014) گزارش کردند که استفاده از ۲۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم کروم در شرایط تنش گرمایی باعث افزایش وزن پوسته تخم‌مرغ می‌شود. موافق با این نتایج، یوبانیک و همکاران (Uyanik et al., 2002) گزارش کردند که افزودن ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم کلرید کروم به جیره مرغهای تخم‌گذار تأثیر معنی‌داری بر ضخامت پوسته تخم‌مرغ ندارد. همچنین لین و همکاران (Lien et al., 1996) نیز نشان دادند که افزودن پیکولینات کروم به جیره مرغهای تخم‌گذار ضخامت پوسته را تحت تأثیر قرار نداد. ساهین و همکاران (Sahin et al., 2005) نیز در مطالعه خود در بلدرچین‌های تخم‌گذار کاهش خطی شاخص شکل تخم‌مرغ را گزارش کردند. مایسا (Maysa, 2011) نیز نشان داد که افزودن مکمل کروم به جیره مرغهای تخم‌گذار تأثیر معنی‌داری بر شاخص شکل تخم‌مرغ نداشت. همچنین کرمی و همکاران (Karami et al., 2018) نیز گزارش نمودند افزودن کروم تأثیر معنی‌داری بر شاخص شکل تخم‌مرغ نداشت.

جدول ۲- اثرات افزودن سطوح مختلف کروم- متیونین بر صفات عملکرد تولید مرغهای تخم‌گذار از ۷۳ تا ۷۹ هفتگی

Table 2- Effects of dietary supplementation of chromium-methionine on egg laying performance of layer hens at 73-79 weeks

صفات عملکردی Performance traits	سطح کروم- متیونین Chromium- methionine level (μg/kg)							مقایسات متعامد Orthogonal comparisons	
	0	400	800	1200	1600	2000	اشتباه استاندارد میانگین‌ها SEM	خطی Linear	درجه دوم Quadratic
مصرف خوراک روزانه (گرم/مرغ/روز) Feed intake (g/hen/day)	97.17[a]	95.45[b]	95.84[b]	95.49[b]	93.59[c]	91.54[d]	0.380	<0.001	0.0048
ضریب تبدیل خوراک Feed conversion ratio	2.75[a]	2.65[a]	2.64[a]	2.67[a]	2.45[b]	2.37[b]	0.045	0.0001	0.087
تولید تخم‌مرغ (درصد) Egg production (%)	54.40[c]	55.23[c]	56.19[bc]	55.71[c]	58.69[ab]	59.64[a]	0.955	<0.0001	0.330
وزن تخم مرغ (گرم) Egg weight (g)	65.40	65.48	64.92	65.07	65.86	65.96	0.434	0.269	0.176
توده تخم‌مرغ تولیدی روزانه Egg mass (g/d/bird)	35.53[b]	36.15[b]	36.43[b]	36.24[b]	38.64[a]	39.31[a]	0.614	0.0001	0.132

[a, b] میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند (P < 0.05).

[a, b] Means in the same row with different superscripts are significantly different (P < 0.05).

نتایج اثرات سطوح مختلف کروم- متیونین بر صفات کیفیت داخلی تخم‌مرغهای تخم‌گذار در کل دوره در جدول ۴ ارائه شده است. نتایج نشان داد که مکمل کروم آلی ارتفاع سفیده، رنگ زرده و واحد هاو را به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر قرار داد (P<۰/۰۵). ارتفاع سفیده تخم‌مرغ با افزودن ۲۰۰۰ میکروگرم کروم- متیونین در هر کیلوگرم جیره غذایی کاهش معنی‌داری را نسبت به سایر تیمارهای آزمایشی نشان داد، درحالی‌که افزودن سطوح ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ میکروگرم کروم آلی در هر کیلوگرم جیره منجر به افزایش ارتفاع سفیده در مقایسه با گروه کنترل (بدون مکمل کروم- متیونین) شد. حسین (Hossain, 1998) بیان کرد که مکانیسم احتمالی تأثیر کروم بر کیفیت تخم‌مرغ از سه طریق: ۱) نقش کروم در ترکیب ساختمانی آلبومن یا پیوندهای عرضی بین پروتئین‌ها ۲) نقش در سنتز اووموسین که مسئول ساختار ژله‌ای آلبومن است ۳) تسهیل انتقال کاتیون‌ها به داخل آلبومن در طی فرآیندهای پمپاژی در رحم است. بنابراین، می‌توان بیان کرد که با افزودن مقادیر کمتر از ۱۶۰۰ میکروگرم مکمل کروم- متیونین به جیره غذایی مرغهای تخم‌گذار در اواخر دوره تولید، کیفیت سفیده تخم‌مرغ بهبود می‌یابد. افزودن کروم سبب افزایش شاخص رنگ زرده در مقایسه با شاهد شد (P<۰/۰۵). از آنجایی که کاروتنوئیدها که مسئول ایجاد رنگ زرده هستند، جزو ترکیبات محلول در چربی می‌باشند، لذا هر عاملی که

بتواند هضم و جذب چربی‌ها را بهبود بخشد، احتمالاً منجر به افزایش رنگ زرده تخم‌مرغ خواهد شد. ساهین و همکاران (Sahin *et al.*, 2005) گزارش کردند استفاده از مکمل کروم سبب افزایش قابلیت هضم چربی‌ها می‌گردد. افزودن مکمل کروم- متیونین به‌جز تیمار ۲۰۰۰ میکروگرم کروم آلی در هر کیلوگرم جیره غذایی سبب افزایش واحد هاو در مقایسه با گروه کنترل گردید. واحد هاو معیاری برای تعیین کیفیت سفیده تخم‌مرغ است که کیفیت تخم‌مرغ را تعیین می‌کند (Karami *et al.*, 2018).

جدول ۳- اثرات افزودن سطوح مختلف کروم- متیونین بر صفات کیفیت خارجی تخم‌مرغ‌های تخم‌گذار در کل دوره آزمایش (۷۳ تا ۷۹ هفتگی)

Table 3- Effects of dietary supplementation of chromium-methionine on external egg quality traits of laying hens from 73 to 79 weeks of age

عامل Factor	شاخص شکل تخم‌مرغ (٪) Egg shape index (%)	وزن پوسته (گرم) Shell weight (g)	درصد پوسته (٪) Shell percentage (%)	ضخامت پوسته (میکرومتر) Shell thickness (µm)
	کروم- متیونین(میکروگرم در کیلوگرم) Chromium-methionine (µg/kg)			
0	76.63	5.33[c]	8.51	0.39
400	77.22	5.54[bc]	8.74	0.39
800	76.35	5.47[bc]	8.99	0.37
1200	77.65	5.58[bc]	9.02	0.38
1600	77.09	5.92[ab]	9.20	0.38
2000	77.21	6.05[a]	9.50	0.36
مدت نگهداری (روز) Storage period (d)				
تازه Fresh	76.83	5.35[b]	8.78	0.38
7	77.28	5.60[ab]	8.88	0.37
14	76.87	5.84[a]	9.23	0.38
دمای نگهداری (^oC) Storage temperature (^oC)				
4	77.13	5.61	8.92	0.38
25	76.86	5.70	9.10	0.38
سطح معنی‌داری P-value				
کروم- متیونین CrMet	0.813	0.022	0.242	0.215
مدت نگهداری Storage period	0.570	0.020	0.264	0.603
دمای نگهداری Storage temperature	0.420	0.752	0.703	0.348
کروم- متیونین× مدت نگهداری CrMet × storage period	0.704	0.379	0.830	0439
کروم- متیونین × دمای نگهداری CrMet × storage temperature	0.898	0.744	0.787	0.898
مدت نگهداری × دمای نگهداری Storage period × storage Temperature	0.338	0.260	0.955	0.307
کروم متیونین× مدت نگهداری × دمای نگهداری CrMet× storage period × storage temperature	0.473	0.504	0.329	0.350

a, b میانگین‌های هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند ($P < 0.05$).

a, b Means in the same column with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

جدول ٤- اثرات افزودن مختلف کروم- متیونین بر صفات کیفیت داخلی تخم‌مرغ مرغ‌های تخم‌گذار در کل دوره آزمایش (۷۳ تا ۷۹ هفتگی)

Table 4- Effects of dietary supplementation of chromium-methionine on internal egg quality traits of laying hens during the entire experimental period (from 73 to 79 weeks of age)

عامل Factor	ارتفاع سفیده (میلی‌متر) Albumen height (mm)	ارتفاع زرده (میلی‌متر) Yolk height (mm)	رنگ زرده Yolk color	شاخص زرده Yolk index	pH زرده Yolk Ph	pH سفیده Albumen pH	درصد زرده Yolk percentage (%)	درصد سفیده Albumen percentage (%)	واحد هاو Haugh unit
کروم- متیونین Chromium-methionine (µg/kg)									
0	8.19[b]	18.37	6.63[b]	23.64	6.20	8.68	29.55	61.93	88.97[b]
400	8.72[a]	17.92	6.86[a]	23.50	6.17	8.73	28.45	62.80	92.34[a]
800	8.88[a]	18.00	6.90[a]	23.66	6.24	8.63	29.94	61.06	93.23[a]
1200	8.93[a]	17.62	7.06[a]	23.43	6.24	8.95	28.43	62.54	93.04[a]
1600	8.63[ab]	17.94	7.00[a]	23.21	6.25	8.71	28.48	62.31	91.25[ab]
2000	7.70[c]	17.93	7.03[a]	24.11	6.18	8.65	28.96	61.36	85.67[c]
مدت نگهداری (روز) Storage period (d)									
تازه Fresh	8.82[a]	17.99	7.00	23.79[ab]	6.17[b]	8.65[b]	29.56	61.68	92.91[a]
7	8.62[a]	18.07	6.83	22.81[b]	6.18[b]	8.65[b]	28.48	62.62	91.12[ab]
14	8.24[b]	17.85	6.96	24.27[a]	6.27[a]	8.88[a]	29.15	61.54	89.31[b]
دمای نگهداری (°C) Storage temperature (C°)									
4	8.58	17.93	6.94	23.37	6.22	8.70	29.03	61.04	90.96
25	8.41	18.02	6.87	23.92	6.21	8.77	28.87	61.95	90.43
اثر متقابل مدت نگهداری (روز) × دمای نگهداری (°C) Interaction effect of storage period (d) × storage temperature (°C)									
تازه × ۲۵ (°C) Fresh ×25 °C	8.82	17.99[a]	7.00	23.73	6.17[b]	8.56[b]	29.56[a]	61.69	92.91
۷ (روز) × ۴ (°C) 7 (d) ×4 °C	8.64	18.32[a]	6.81	23.03	6.20[b]	8.75[ab]	29.05[a]	62.01	91.74
۷ (روز) × ۲۵ (°C) 7 (d) ×25 °C	8.60	17.82[b]	6.86	23.84	6.18[b]	8.57[b]	27.92[b]	63.25	90.51
۱۴ (روز) × ۴ (°C) 14 (d) ×4 °C	8.27	17.73[b]	6.94	24.01	6.23[b]	8.79[ab]	28.70[ab]	61.89	89.13
۱۴ (روز) × ۲۵ (°C) 14 (d) ×25 °C	8.22	17.98[a]	6.97	23.96	6.32[a]	8.97[a]	29.61[a]	61.19	89.49

سطح معنی داری
P-value

Table 4 Continue ادامه جدول ٤

کروم- متیونین CrMet	0.0002	0.178	0.007	0.904	0.067	0.109	0.276	0.478	0.0001
مدت نگهداری Storage period	0.011	0.372	0.155	0.003	0.0001	0.001	0.146	0.156	0.005
دمای نگهداری Storage temperature	0.724	0.438	0.565	0.083	0.162	0.990	0.817	0.651	0.610
کروم- متیونین× مدت نگهداری CrMet ×storage period	0.106	0.196	0.439	0.680	0.226	0.249	0.354	0.785	0.080
کروم- متیونین × دمای نگهداری CrMet × storage temperature	0.049	0.497	0.353	0.921	0.152	0.553	0.894	0.849	0.045
مدت نگهداری × دمای نگهداری Storage period × storage temperature	0.946	0.025	0.847	0.067	0.007	0.010	0.034	0.110	0.357
کروم- متیونین× مدت نگهداری × دمای نگهداری CrMet × storage period× storage temperature	0.008	0.455	0.644	0.345	0.071	0.048	0.082	0.090	0.017

[a, b] میانگین‌های هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند (P < 0.05).

[a, b] Means in the same column with different superscripts are significantly different (P < 0.05).

با افزایش مدت زمان نگهداری تخم‌مرغ، کاهش معنی‌داری در ارتفاع سفیده دیده شد. این اثرات به‌صورت مشابهی برای واحد هاو نیز مشاهده شد (P<۰/۰۵). سیریرات و همکاران (Sirirat et al., 2013) گزارش کردند که افزودن سطوح مختلف مکمل کروم به جیره غذایی مرغ‌های تخم‌گذار باعث افزایش معنی‌دار واحد هاو در مقایسه با گروه شاهد شد. درحالی‌که جهانیان و میرفندرسکی (Jahanian and Mirfendereski, 2015) گزارش کردند که با افزودن مکمل کروم- متیونین واحد هاو کاهش یافت. اثر متقابل کروم آلی و مدت زمان نگهداری تخم‌مرغ بر صفات کیفیت داخلی تخم‌مرغ معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). اثر متقابل بین کروم –متیونین و دمای نگهداری بر صفات ارتفاع سفیده و واحد هاو معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). به نظر می‌رسد، با توجه به اینکه با افزایش مدت زمان نگهداری تخم‌مرغ ارتفاع سفیده و به تبع آن واحد هاو کاهش می‌یابد، چنین نتیجه‌ای مورد انتظار است. اثر متقابل بین مدت زمان و دمای نگهداری تخم‌مرغ بر صفات کیفیت داخلی تخم‌مرغ از جمله ارتفاع زرده، pH زرده و سفیده تخم‌مرغ، و درصد زرده معنی‌دار بود. اثر متقابل سه‌گانه بین کروم- متیونین و مدت زمان نگهداری و دمای نگهداری تخم‌مرغ بر ارتفاع سفیده، pH سفیده و واحد هاو معنی‌دار بود (P<۰/۰۵).به نظر می‌رسد که علت معنی‌دار بودن ارتفاع سفیده، به کاهش ارتفاع سفیده با افزایش مدت زمان نگهداری تخم‌مرغ مربوط باشد.

فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون

نتایج اثرات سطوح مختلف کروم- متیونین بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم خون مرغ‌های تخم‌گذار در کل دوره در جدول ۵ ارائه شده است. نتایج نشان می‌دهد که افزودن کروم- متیونین به جیره غذایی غلظت تری‌گلیسرید، کلسترول، گلوکز و مالون دی‌آلدهید سرم خون مرغ‌های تخم‌گذار را تحت تأثیر قرار داد (P<۰/۰۵). به‌دلیل اثرگذاری مکمل کروم به کارکرد بهتر انسولین، می‌توان کاهش میزان تری‌گلیسرید سرم خون با افزودن ۴۰۰ میکروگرم کروم آلی در هر کیلوگرم جیره غذایی را ناشی از کاهش میزان لیپولیز و یا جلوگیری از به هم خوردن موقعیت تری‌گلیسرید (کاهش انتقال) در بافت‌های محیطی دانست (Subiyatno *et al.*, 1996). کاربرد کروم در جیره مرغ‌های تخم‌گذار (Lien *et al.*, 2003) و گاوهای شیری دوره انتقال هم (Subiyatno *et al.*, 1996) توانست به کاهش معنی‌دار غلظت تری‌گلیسرید خون در حیوانات منجر شود. میزان کلسترول سرم خون در تیمار حاوی ۸۰۰ میکروگرم کروم- متیونین در کیلوگرم نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌دار داشت. مطالعات متعدد نشان می‌دهد که کروم برای متابولیسم لیپیدها و کاهش خطر آتروژنز ضروری است. برای مثال، موش‌ها و خرگوش‌هایی که از جیره‌هایی با کمبود کروم استفاده می‌کردند، کلسترول و چربی بیشتری در خون داشته و شکل‌گیری پلاک در رگ‌های آن‌ها بیشتر بود (Mowat, 1997). موافق با پژوهش حاضر، جهانیان و میرفندرسکی (Jahanian and Mirfendereski, 2015) نشان دادند که غلظت کلسترول پلاسمای مرغ‌های تخم‌گذار با افزودن ۱۰۰۰ میکروگرم در کیلوگرم کروم (کروم- متیونین) جیره کاهش یافت. در مطالعه حاضر نیز تیمار ۸۰۰ میکروگرم کروم- متیونین در کیلوگرم نسبت به سایر تیمارهای آزمایشی به جزء تیمار ۴۰۰ میکروگرم کروم- متیونین در کیلوگرم، سطح کلسترول کمتری داشت (P<۰/۰۵). هیچ یک از پارامترهای پروتئینی سرم (پروتئین کل، آلبومین، گلوبولین) تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند. اوندرچی و همکاران (Onderci *et al.*, 2003) نشان دادند که غلظت پروتئین کل سرم مرغ‌های تخم‌گذار پرورش یافته در دمای محیطی پایین با مکمل کروم افزایش یافت. افزایش غلظت پروتئین کل سرم با استفاده از مکمل کروم در جیره غذایی توسط ترکی و همکاران (Torki *et al.*, 2014) مشاهده شد؛ زمانی‌که ۲۰۰ تا ۴۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم کروم (کروم پیکولینات) در جیره مرغ‌های تخم‌گذار تحت شرایط استرس گرمایی استفاده کردند. همچنین گزارش نمودند که غلظت آلبومین سرم نیز افزایش یافت، غلظت اسیداوریک و آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز سرم خون مرغ‌های تخم‌گذار در اواخر دوره تولید (۷۹ هفتگی) تحت تأثیر سطوح افزودن کروم- متیونین جیره‌های غذایی قرار نگرفت. ما و همکاران (Ma *et al.*, 2014) نشان دادند که مکمل ۲۰۰ میکروگرم در کیلوگرم کروم غلظت اسیداوریک را تا ۳۱ درصد کاهش داد. با این حال، مشابه نتایج مطالعه حاضر، سامانتا و همکاران (Samanta *et al.*, 2008) نشان دادند که غلظت اسیداوریک سرم برای جوجه‌های دریافت‌کننده ۵۰۰ یا ۱۰۰۰ میکروگرم در کیلوگرم کروم (کروم پیکولینات) و آن‌هایی که جیره شاهد دریافت کردند مشابه بود. مطابق نتایج جدول ۵، میزان گلوکز سرم خون با افزودن کروم- متیونین به جیره غذایی در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۵). طبق گزارش پالویک و همکاران (Palvik *et al.*, 2007) سطح گلوکز خون توسط مکانیسم‌های هموستاتیک حساسی، پیوسته در سطح نسبتاً ثابتی حفظ می‌شود و میزان آن به مرحله رشد و بلوغ، مصرف خوراک، عملکرد تولیدی و تغییرات محیطی بستگی دارد. کروم یک کوفاکتور برای فعالیت انسولین بوده و برای استفاده طبیعی از گلوکز و رشد حیوان لازم است و برای متابولیسم طبیعی گلوکز ضروری و یکی از اجزای فاکتور تحمل گلوکز GTF می‌باشد که از طریق انسولین، گلوکز را وارد سلول کرده و تولید انرژی می‌کند. انسولین منجر به تنظیم متابولیسم کربوهیدرات‌ها، پروتئین و نیز استفاده از گلوکز می‌شود (Sahin *et al.*, 2002). مشابه نتایج مطالعه حاضر، ساهین و همکاران (Sahin *et al.*, 2005) گزارش کردند که افزودن مکمل

کروم به جیره بلدرچین‌ها باعث کاهش گلوکز خـون به‌صـورت خطـی شد. لین و همکاران (Lien *et al.*, 1996) گزارش کردنـد کـه جیـره حاوی ۴۰۰ یا ۸۰۰ میکروگرم در کیلوگرم کروم باعث کـاهش گلـوکز خون در مرغ‌های تخم‌گذار شد. در مطالعه حاضـر، اسـتفاده از مکمـل کروم آلی در جیره غذایی مرغ‌های تخم‌گذار در اواخر دوره تولیـد (۷۹ هفتگی) مشخص ساخت که غلظت مالون دی آلدهید سـرم خـون بـا افزودن ۱۶۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم کروم- متیونین در جیره غـذایی در مقایسـه بـا جیـره شـاهد کـاهش یافـت. مـالون دی‌آلدهیـد یکـی از محصـولات نهـایی پراکسیداسـیون اسـیدهای چـرب غیراشـباع در فسفولیپیدها است و مسئول آسیب غشای سلولی است. بیان شده است کـه کـروم سـه ظرفیتـی رادیکـال‌هـای هیدروکسـیل را از پراکسـید هیدروژن از طریق چرخه هابر- ویز (Haber-Weiss) تولید مـی‌کنـد که می‌تواند تولید آنتی‌اکسـیدان را تحریـک کنـد (Samanta *et al.*, 2008). مطابق با نتایج این تحقیق، پریوس و همکـاران (Preuss *et al.*, 1997) گزارش کردنـد کـه تشـکیل مـالون دی‌آلدهیـد کبـدی، نشانگر پراکسیداسیون لیپیدی، در کبد با مکمل‌سازی کروم پیکولینات و کروم نیکوتینـات در موش‌هـای صـحرایی کـاهش یافـت و کـروم به‌عنوان یک آنتی اکسیدان عمل کرد.

جدول ۵- اثرات سطوح مختلف کروم- متیونین بر فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون مرغ‌های تخم‌گذار از ۷۳ تا ۷۹ هفتگی

Table 5- Effects of dietary supplementation of chromium-methionine on biochemical factors of blood serum of layer hen from 73 to 79 weeks of age

فاکتورهای بیوشیمیایی Biochemical factors	سطح کروم- متیونین (میکروگرم در کیلوگرم) Chromium- methionine (µg/kg)						اشتباه استاندارد میانگین‌ها SEM	سطح معنی داری P-value
	0	400	800	1200	1600	2000		
تری‌گلیسرید Triglyceride (mg/dl)	2680.4[ab]	1562.8[b]	1844.4[ab]	2790.8[a]	2010.6[ab]	2917[a]	10.755	0.0036
کلسترول Cholesterol (mg/dl)	202.00[a]	175.60[ab]	145.00[b]	194.80[a]	191.00[a]	196.40[a]	1.992	0.0014
پروتئین کل Total protein (g/dl)	5.12	5.80	5.54	5.80	5.52	5.58	0.349	0.539
آلبومین Albumin (g/dl)	2.38	2.38	1.96	2.36	2.28	2.48	0.267	0.299
گلوبولین Globulin	2.73	3.42	3.58	3.44	3.24	3.10	0.336	0.244
اسیداوریک Uric acid (mg/dl)	4.04	3.32	2.94	4.10	2.76	4.36	0.503	0.260
آلانین آمینو ترانسفراز ALT[1] (U/L)	21.40	25.80	28.40	27.20	29.00	31.60	1.501	0.795
آسپارتات آمینوترانسفراز AST[2] (U/L)	180.20	193.60	175.80	188.80	220.20	208.00	2.539	0.268
گلوکز Glucose (mg/dl)	223.80[a]	169.20[b]	131.80[b]	166.60[b]	161.60[b]	173.60[b]	2.096	<0.0001
مالون دی آلدهید MDA[3] (U/L)	4.47[a]	3.44[ab]	3.71[ab]	3.10[ab]	2.84[b]	2.78[b]	0.385	0.012

[a, b] میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند ($P < 0.05$).

[a, b] Means in the same row with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

[1] Alanine Aminotransferase

[2] Aspartate Aminotransferase

[3] Malondialdehyde

پاسخ سیستم ایمنی هومورال

نتایج اثرات سطوح مختلف کـروم- متیـونین بـر پاسخ سیسـتم ایمنی مرغ‌های تخم‌گذار در کل دوره در جـدول ۶ ارائـه شـده اسـت. نتایج نشان می‌دهد که افزودن کروم- متیونین به جیره غـذایی سـبب افـزایش تولیـد آنتی‌بـادی بـر علیـه آنتـی‌ژن SRBC گردیـده اسـت (P<۰/۰۵). بیشـترین تیتـر آنتی‌بـادی کـل (IgT) بـا افـزودن ۱۶۰۰ میکروگرم کروم- متیونین بـه جیـره غـذایی (۸/۳۳) و کمتـرین آن از لحاظ عددی مربوط به شاهد و بدون افزودن کروم- متیـونین (۵/۳۳) مشاهده شد. همچنین اثر افزودن سطوح مختلف کروم- متیـونین بـه جیره غذایی بر تیتـر ایمونوگلوبـولین M (IgM) تولیـد شـده بـر علیـه آنتی‌ژن SRBC، معنی‌دار بود و بیشترین تیتر IgM در پرندگان تغذیه شـده بـا ۲۰۰۰ و ۱۶۰۰ میکروگـرم کـروم- متیـونین در مقایسـه بـا

پرندگانی بود که ۴۰۰ میکروگرم کروم- متیونین و بدون را دریافت کردند. ایمنی هومورال با تولید آنتی‌بادی توسط سلول‌های B منعکس می‌شود، بنابراین، سلول‌های B سلول‌های اصلی مسئول ایمنی هومورال هستند. مطالعات حیوانی ثابت کرده‌اند که کروم اثرات قابل توجهی بر ایمنی هومورال دارد. مکمل کروم پروپیونات می‌تواند تیتر آنتی‌بادی سرم و محتوای ایمونوگلوبولین را در خوک‌های از شیر گرفته افزایش دهد (Lien et al., 2005). مکمل کروم سه ظرفیتی می‌تواند به‌طور قابل توجهی محتوای ایمونوگلوبولین‌ها را تحت شرایط استرس شدید افزایش دهد (Zhang et al., 2009).

جدول ٦- اثرات سطوح مختلف کروم- متیونین بر پاسخ سیستم ایمنی هومورال مرغ‌های تخم‌گذار در کل دوره آزمایش

Table 6- Effects of different levels of chromium-methionine on the response of the humoral immune system of laying hens during the entire experimental period

فاکتورهای بیوشیمیایی Biochemical factors	سطح کروم- متیونین (میکروگرم در کیلوگرم) Chromium- methionine (µg/kg)							P-value
	0	400	800	1200	1600	2000	SEM	
ایمونوگلوبولین کل IgT	5.33[d]	6.00[cd]	5.66[d]	6.83[bc]	8.33[a]	7.33[b]	0.336	0.0001
ایمونوگلوبولین G IgG	1.83	2.50	2.00	3.16	3.00	1.83	0.311	0.065
ایمونوگلوبولین M IgM	3.00[d]	4.50[c]	5.83[b]	6.16[b]	7.33[a]	6.83[ab]	0.345	0.0001

[a, b] میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند ($P < 0.05$).

[a, b] Means in the same row with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری کلی

در مجموع، استفاده از کروم- متیونین به‌میزان ۱۶۰۰ میکروگرم در کیلوگرم می‌تواند منجر به بهبود صفات عملکردی تولید از جمله ضریب تبدیل خوراک، درصد تولید تخم‌مرغ و گرم تخم‌مرغ تولیدی روزانه، صفات کیفیت تخم‌مرغ از قبیل واحد هاو و ارتفاع سفیده، کاهش غلظت مالون دی‌آلدهید سرم و عملکرد سیستم ایمنی در مقایسه با گروه شاهد شد.

References

1. Habibian, M., Ghazi, S., & Moeini, M. M. (2013). Lack of effect of dietary chromium supplementation on growth performance and serum insulin, glucose, and lipoprotein levels in broilers reared under heat stress condition. *Biological Trace Element Research*, *153*(1), 205-211. https://doi.org/10.1007/s12011-013-9663-2
2. Hayirli, A. (2005). Chromium nutrition of livestock species. In Nutrition Abstracts and Reviews. Series B. *Livestock Feeds and Feeding*, *75*(5). CAB International.
3. Hossain, S.M. (1998). Organic chromium in poultry: Metabolic responses, effects on broiler carcass composition, nutrient composition of eggs. In: Lyons, T. P. and K. A. Jacques (Eds.). Biotech in the Feed Industry. Nottingham University Press, Nottingham, UK 203-216.
4. Jahanian, R., & Mirfendereski, E. (2015). Effect of high stocking density on performance, egg quality, and plasma and yolk antioxidant capacity in laying hens supplemented with organic chromium and vitamin C. *Livestock Science*, *177*, 117-124. https://doi.org /10.1016/ j.livsci. 2015.04.022
5. Jeejeebhoy, K. N., Chu, R. C., Marliss, E. B., Greenberg, G. R., & Bruce-Robertson, A. (1977). Chromium deficiency, glucose intolerance, and neuropathy reversed by chromium supplementation, in a patient receiving long-term total parenteral nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *30*(4), 531-538. https://doi.org/10.1093/ajcn/30.4.531
6. Karami, M., Torki, M., & Mohammadi, H. (2018). Effects of dietary supplemental chromium methionine, zinc oxide, and ascorbic acid on performance, egg quality traits, and blood parameters of laying hens subjected to heat stress. *Journal of Applied Animal Research*, 46(1), 1174-1184. https://doi.org/10.1080/09712119.2018.1481411
7. Khan, R. U., Naz, S., Dhama, K., Saminathan, M., Tiwari, R., Jeon, G. J., Laudadio, V & Tufarelli, V. (2014). Modes of action and beneficial applications of chromium in poultry nutrition, production and health: A review. *International Journal of Pharmacology*, *10*(7), 357–367. https://doi.org/10.3923/ijp.2014.357.367.
8. Kim, Y. H., Han, I. K., Shin, I. S., Chae, B. J., & Kang, T. H. (1996). Effect of dietary excessive chromium picolinate on growth performance, nutrient utilizability and serum traits in broiler chicks. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *9*(3), 349-354. https://doi.org/10.5713/ajas.1996.349.

9. Kuehn, L. A., Price, S. E., Honaker, C. F., & Siegel, P. B. (2006). Antibody response of chickens to sheep red blood cells: crosses among divergently selected lines and relaxed sublines. *Poultry Science*, *85*(8), 1338-41. https://doi.org/10.1093/ps/85.8.1338.
10. Lien, T. F., Yang, K. H., Lin, K. J. (2005) Effects of chromium propionate supplementation on growth performance, serum traits and immune response in weaned pigs. *Asian-Aust Journal of Animal Science*, *18*, 403-408. https://doi.org/10.5713/ajas.2005.403.
11. Lien, T. F., Wu, C. P., & Lu, J. J. (2003). Effects of cod liver oil and chromium picolinatesupplements on the serum traits, egg yolk fatty acids and cholesterol content in laying hens. *Asian-Aust. Journal of Animal Science*, *16*, 1177–1181. https://doi.org/10.5713/ ajas.2003.1177.
12. Lien, T. F., Chen, S., Shiau, S., Froman, D., & Hu, C. (1996). Y. Chromium picolinate reduces laying hen serum and egg yolk cholesterol. Profess. *Animal Science*, *12(*2), 77–80. https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)32493-1.
13. Luo, X., Guo, Y. L., Liu, B., Hao, Z. L., Chen, J. L., Gao, F. S., & Yu, S. X. (1999). Effect of dietary chromium on growth, serum biochemical traits and immune responses of broiler chicks during 0–3 weeks of age. *Acta Veterinary et Zootechnica Sinica*, *30*, 481–489.
14. Ma, W., Gu, Y., Lu, J., Yuan, L., & Zhao, R. (2014). Effects of chromium propionate on egg production, egg quality, plasma biochemical parameters, and egg chromium deposition in late-phase laying hens. *Biological trace element research*, *157*(2), 113–119. https://doi.org/ 10.1007/ s12011-013-9875-5.
15. Maysa, M. H. (2011). Influence of adding organic chromium in diet on productive traits, serum constituents and immune status of Bandarah laying hens and semen physical properties for cocks in winter season. *Egyptian Poultry Science Journal*, *31*(2), 203-216.
16. Mowat, D. N. (1997). Organic chromium in animal nutrition. Chromium Books 6 Mayfield Avenue Guelph, ON N1G 2L8 Canada.
17. Nasiroleslami, M., & Torki, M. (2011). Egg quality characteristics and productive performance of laying hens fed diets supplemented by *Echinacea purpurea* extract, immunizing and vitamin E. *Glob. Veterin*, 7(3), 270-275.
18. Nattapon, S., Jin-Jenn, L., Alex, T., & Tu-Fa Lien, T. (2012). Effect of different level of nanoparticles of Cr picolinate supplementation on performance, egg quality, retention and tissue mineral accumulation in layers. *Journal of Agricultural Science*, 5(2), 150-159. https://doi.org/10.5539/jas.v5n2p150.
19. Onderci, M., Sahin, N., Sahin, K., & Kilic, N. (2003). Antioxidant properties of chromium and zinc: *In vivo* effects on digestibility, lipid peroxidation, antioxidant vitamins, and some minerals under a Low ambient temperature. *Biological trace element research*, *92*(2), 139–150. https://doi.org/10.1385/BTER:92:2:139.
20. Palvik, A., Pokludova, M., Zapletal, D., & Jelinek, P. (2007). Effect of housing systems on biochemical indicators of blood plasma in laying hens. *Acta Veterinary*, *76*(3), 339-347. https://doi.org/10.2754/avb200776030339.
21. Pechova, A., & Pavlata, L. (2007). Chromium as an essential nutrient: A review. *Veterinary Medicine*, 52(1), 1-18. doi: 10.17221/2010-VETMED.
22. Preuss, H. G., Grojec, P. L., Lieberman, S., & Anderson, R. A. (1997). Effects of different chromium compounds on blood pressure and lipid peroxidation in spontaneously hypertensive rats. *Clinical Nephrology*, *47*(5), 325–330.
23. Sahin, K., Ozbey, O., Onderci, M., Cikim, G., & Aysondu, M. H. (2002). Chromium supplementation can alleviate negative effects of heat stress on egg production, egg quality and some serum metabolites of laying Japanese quail. *The Journal of nutrition*, *132*(6), 1265–1268. https://doi.org/10.1093/jn/132.6.1265.
24. Sahin, N., Sahin, K., Onderci, M., Gursu, M. F., Cikim, G., Vijaya, J., Kucuk, O. (2005). Chromium picolinate, rather than biotin, alleviates performance and metabolic parameters in heat stressed quail. *British Poultry Science*, *46*(4), 457-463. https://doi.org/10.1080/00071660500190918
25. Samanta, S., Haldar, S., Bahadur, V., & Ghosh, T. K. (2008). Chromium picolinate can ameliorate the negative effects of heat stress and enhance performance, carcass and meat traits in broiler chickens by reducing the circulatory cortisol level. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *88*(5), 787–796. https://doi.org/10.1002/jsfa.3146.
26. SAS. 2004. SAS User's Guide: Statistics. Version 9.1 Edition. SAS Institute Inc., Cary, NC.
27. Sirirat, N., Lu, J., Alex, J., Hung, T. Y., & Lien, T. F. (2013). Effect of different levels of nanoparticles chromium picolinate supplementation on performance, egg quality, mineral retention, and tissues minerals accumulation in layer chickens. *Journal of Agricultural Science*, *5*(2), 150-159. https://doi.org/10.5539/jas.v5n2p150.
28. Subiyatno, A., Mowat, D. N., & Yang, W. Z. (1996). Plasma metabolite response toglucose infusion in dairy cows supplemented with chelated chromium. *Journal of Dairy Science*, *79*, 1436-1445. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76502-5.
29. Torki, M., Zangeneh, S., & Habibian, M. (2014). Performance, egg quality traits, and serum metabolite concentrations of laying hens affected by dietary supplemental chromium picolinate and vitamin C under a heat-stress condition. *Biological Trace Element Research*, *157*(2), 120–129. https://doi.org/10.1007/s12011-013-9872-8.
30. Uyanik, F., Kaya, S., Kolsuz, A. H., Eren, M., & Sahin, N. (2002). The effect of chromium supplementation on egg production, egg quality and some serum parameters in laying hens. *Turkish Journal of Veterinary and Animal*

Sciences, *26*(2), 379-387.
31. Valera, M.; Gutiérrez, O., & Elías, A. (2019). Organic products based on chromium for poultry production. Main advances in the last years. *Cuban Journal of Agricultural Science*, *53*(3), 219-230.
32. Zhang, C. H., Jiang, J. Y., Ren, H. Y., Zhu, F. H., Li, L. W. (2009) Effects of chromium yeast on immune function and carcass quality in heat stressed broilers. *Acta Ecologiae Animalis Domastici*, *5*, 56-61.
33. Zhang, S., Sun, X., Liao, X., Lu, L., Zhang, L., Ma, Q., & Luo, X. (2018). Dietary supplementation with chromium picolinate influences serum glucose and immune response of brown-egg laying hens. *Biological Trace Element Research*, *185*(2), 448-455. http://doi.org/10.1007/s12011-017-1232-7.